

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-327000
(P2002-327000A)

(43) 公開日 平成14年11月15日 (2002. 11. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 K 14/02	Z N A	C 0 7 K 14/02	Z N A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/29		A 6 1 K 39/29	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/16		A 6 1 P 1/16	
31/12		31/12	
G 0 1 N 33/576		G 0 1 N 33/576	B
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L 外国語出願 (全 22 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-101389(P2001-101389)
(22) 出願日 平成13年3月30日 (2001. 3. 30)
(31) 優先権主張番号 1 9 3 7 9 5
(32) 優先日 平成12年3月31日 (2000. 3. 31)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501131014
オーソークリニカル・ダイアグノスティック
クス・インコーポレイテッド
Ortho-Clinical Diag
nostics, Inc.
アメリカ合衆国、14626-5101 ニューヨ
ーク州、ロチェスター、インディゴ・クリ
ーク・ドライブ 100
(74) 代理人 100066474
弁理士 田澤 博昭 (外1名)

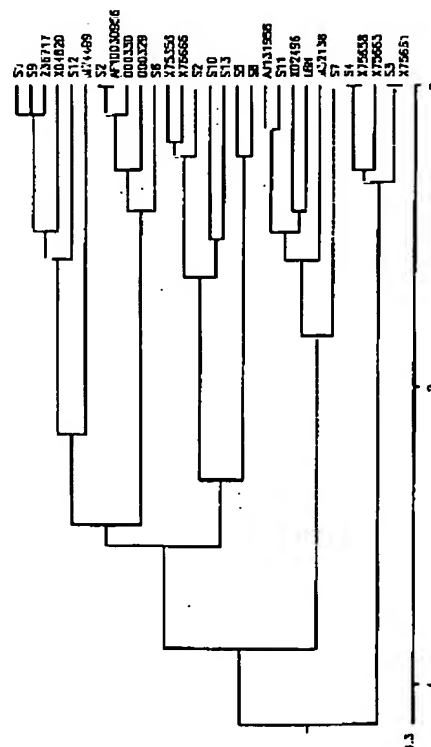
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なB型肝炎ウイルス

(57) 【要約】

【課題】 B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs・Ag) の新規な表面変異体を提供する。

【解決手段】 本発明の変異体はHBs・Agおよび同等に長期に持続する抗HBコア (c) IgM抗体 (Ab) を伴う抗HBs・Ab (抗B型肝炎表面抗体) の両方に対して一定して陽性であることが知られているダウン症候群の症状を有する症候性の患者から単離した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ酸シーケンスを含む単離した変異体B型肝炎表面抗原において、B型肝炎野生型ayw2株からの変異が、位置103においてイソロイシンがメチオニンの代わりに存在し、位置118においてリジンがトレオニンの代わりに存在し、位置120においてグルタミンがプロリンの代わりに存在し、位置170においてセリンがロイシンの代わりに存在し、位置213においてセリンがロイシンの代わりに存在するように生じる変異体B型肝炎表面抗原。

【請求項2】 検査サンプル中におけるB型肝炎の存在を決定するための方法において、

(a) 検査サンプルを請求項1に記載の変異体B型肝炎表面抗原に対応して培養した固相に付着した少なくとも1種類のモノクローナル抗体に接触させて混合物を形成する工程と、

(b) 前記混合物を抗原-抗体の複合体を形成するのに十分な時間および条件下でインキュベートする工程と、

(c) 前記複合体を当該複合体に対して特異的な信号発生試薬に接合している抗体に接触させる工程と、

(d) 前記発生された信号を検出することにより前記検査サンプル中におけるB型肝炎の存在を決定する工程とを備えている方法。

【請求項3】 検査サンプル中におけるB型肝炎の存在を決定するための方法において、

(a) 検査サンプルを固相に付着した少なくとも1種類のモノクローナル抗体に接触させて混合物を形成する工程と、

(b) 前記混合物を抗原-抗体の複合体を形成するのに十分な時間および条件下でインキュベートする工程と、

(c) 前記複合体を当該複合体に対して特異的な信号発生試薬に接合している抗体に接触させる工程と、

(d) 前記信号発生試薬から発生された信号を検出することにより前記検査サンプル中におけるB型肝炎の存在を決定する工程とを備えており、

前記モノクローナル抗体がアミノ酸シーケンスを含む変異体B型肝炎表面抗原に対応して培養されたモノクローナル抗体であり、当該変異体B型肝炎表面抗原において、B型肝炎野生型ayw2株からの変異が、位置103においてイソロイシンがメチオニンの代わりに存在し、位置118においてリジンがトレオニンの代わりに存在し、位置120においてグルタミンがプロリンの代わりに存在し、位置170においてセリンがロイシンの代わりに存在し、位置213においてセリンがロイシンの代わりに存在するように生じる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はHBVの新規な表面変異体に関し、特に、ダウン症候群を有する症候性患者から単離した変異体に関する。

【0002】

【従来の技術】 小形の二重鎖または二本鎖DNAウイルスであるB型肝炎ウイルス(HBV)は無症候保菌者状態、急性の自己限定性肝炎、劇症肝炎、および慢性肝炎、肝硬変、および肝細胞癌を含む慢性肝臓病のような広範囲の臨床的現象を生じ得る。このウイルスは3182個乃至3221個の塩基対(bp)の円形ゲノムを有している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 4種類の主な亜類型(subtypes)が同定されていて、HBV表面上の異なるエピトープを認識する抗体により分化できる。HBs・Ag(B型肝炎表面抗原)粒子は共通の決定因子「a」、ならびに、「d」または「y」および「w」または「r」の亜類型決定因子を担持しており、4種類の主な亜類型、すなわち、adw, adr, aywおよびayrに分類される。稀な血清において、これら全ての4種類の亜類型決定因子(adywr)を含むHBs・Ag粒子が含有されている。これらの主なHBV亜類型adw, adr, aywおよびayrに対応する抗原性決定因子は表面すなわち「S」ポリペプチド内に存在している。特に、コドン位置122およびコドン位置160においてS遺伝子によりコード化される2種類のアミノ酸残基がこれらの異なる抗原性亜類型を決定すると考えられてきた。一方、プレC(preC)領域がHBe・Ag陰性を生じる変異を示すことが頻繁に報告されている。このウイルスはそのプレゲノム(pregenomic)RNAの逆トランスクリプターゼによる複製モードにより、その他のDNAウイルスに比較して高い変異速度を示す。この新規な変異体の重要性はワクチン・エスケープ(vaccine escape)およびHBs・Ag検出不全、公共衛生問題との関わりにおいて反映できる。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者はHBVの新規な表面変異体を同定して特徴付けた。この変異体はHBs・Agおよび同等に長期に持続する抗HBコア(c)IgM抗体(Ab)を伴う抗HBs・Ab(抗B型肝炎表面抗体)の両方に対して一定して陽性であることが知られているダウン症候群を有する症候性の患者から単離した。HBs・Agに対する6種類のモノクローナル抗体(m・Ab(s))のパネルにより、本発明者は「a」決定因子の抗原性の主要エピトープにおける変異の影響を評価した。

【0005】

【発明の実施の形態】 1999年3月にベイルート・メディカル・センターのアメリカン・ユニバーシティに対して黄疸症状を示していたダウン症候群を有する43才の白人男性の患者からサンプルを採取した。この患者はHBVに対する免疫の経験が無く、輸血、静脈内薬物、ホモセクシュアル、家族のHBV感染または血液透析を

含む感染性の危険因子を有していない。調査中において、この患者は上昇した肝機能検査 (LFT) 結果、すなわち、ALT: 450 IU/L (範囲 10 IU/L 乃至 35 IU/L)、AST: 250 IU/L (範囲 10 IU/L 乃至 40 IU/L)、ガンマーGT: 383 IU/L (範囲 10 IU/L 乃至 50 IU/L) を有しており、ビリルビン (Bilirubin) は 3.8/2.6 mg/dL (合計/直接値) (範囲、合計: 0.1 IU/L 乃至 1.2 IU/L および直接値: 0.0 IU/L 乃至 0.2 IU/L) であることが分かった。さらに重要なことは、本発明者は HBV 血液検査における不調和性を発見したことである。また、酵素免疫測定法 (EIA) による HBV マーカー検査結果は、HBs・Ag: 陽性 (>2/0.051)、抗 HBs・Ab: 陽性 (0.417/0.206)、抗 HBc・IgM・Ab: 低度の陽性 (0.371/0.208)、抗 HBc・IgG・Ab: 高度の陽性 (>2/0.412)、HBe・Ag: 陰性、および抗 HBe・Ab: 陽性 (0.197/0.830、競合検定) であった。抗 A型肝炎 Ab (抗体) および抗 C型肝炎抗体 Ab (抗体) の両方は陰性であった。HBV マーカーにおける不一致性により、HBV 抗原 (Ag) を確認するために分子法 (molecular methods) を使用した。

【0006】患者を LFT 検査について継続的に調べて、AST 結果: 80 IU/L を含み、後続の 10 ヶ月間に渡り一定に減少したことが分かった。しかしながら、初期的な表示の後に 10 ヶ月間繰り返して用いられた HBV マーカーは HBs・Ag: 陽性 (>2/0.056) (DiaSorin、イタリア国) および抗 HBs・Ab: 陽性 (56/5) (BioMerieux、Mini-Vidas、フランス国)であることを示し、持続して低度の陽性の抗 HBc・IgM・Ab (0.303/0.221) (DiaSorin、イタリア国) が保たれていることを示した。

【0007】実施例 1: HBs・DNA の抽出および増殖

グアニジニウム-チオシアネート (GuSCN) 溶解法に基づいて 40 μ L のサンプルから DNA を単離して精製した。酸/グアニジニウム-チオシアネート-フェノールクロロホルム抽出処理による RNA 単離の単工程処理方法を一部変更して採用した。5 倍容量の溶解溶液 [5.75 モルの GuSCN、50 ミリモルのトリス-C1 (pH 7.5)、100 ミリモルの 2-メルカプトエタノールおよび 15 μ g/mL のポリ (A)] を 1 倍容量の血清に加えた。短時間の渦混合処理の後に、この混合物を 60°C で 10 分間加熱した。その後、イソプロパノール沈降処理により DNA ペレットを得て、75% エタノールにより洗浄した。さらに、乾燥した DNA ペレットを 50 μ L の PCR 反応溶液の中にそれぞれ 40 マイクロモルの第 1 回目プライマー (F1-6 および R1-6) と共に再懸濁した。この混合物を 95°C で 3

分間加熱した後に、サーマル・サイクラー (thermal cycler) (米国、Perkin Elmer 社、GeneAmp PCR System 9600) において 94°C/45 秒間、55°C/45 秒間および 72°C/45 秒間から成る 30 回の PCR 工程により処理した。次に、0.5 μ L の第 1 回目 PCR 生成物を、アニーリング温度を 60°C まで上昇させたことを除いて、同一の処理工程から成る F1-7 および R13-2 d の各プライマーによる第 2 回目 PCR 増殖処理のためのテンプレートとして用いた。予想したような 604 塩基対 (bp) の DNA 帯域である陽性の PCR 生成物がアガロース・ゲル電気泳動において検出できた。

【0008】HBV・DNA (受け入れ番号 (accession number) J02203) から誘導した上記の PCR プライマー・シーケンス (ヌクレオチド・シーケンス) は以下のようである。

第 1 回目プライマーの組

F1-6 (231 乃至 252): CCTCACAATACCGCAGAGCTA

R1-6 (816 乃至 842): AGGGTTTAAATGTATACCCAAGACAA

第 2 回目プライマーの組

F1-7 (246 乃至 268): GAGTCTAGACTCGTGGTGGATT

R13-2 d (822 乃至 843): ccgaattcTAGGGTTTAAATGTATACCCA

クローニングの目的で EcoR-I 部位を R13-2 d の 5' 端部に添加した。

【0009】実施例 2: シーケンス位置合わせおよび系統分析

増殖した PCR 生成物を QIA クイック・スピン・カラム (Qiagen) により洗浄し、これに続いて、DNA シーケンスおよび蛋白発現に対応してクローニングした。信頼性の高い DNA シーケンス決定を行なうために DNA シーケンス用の 5 種類のクローンを準備した。ABI 377 DNA シーケンサー (米国、PE Applied Biosystems 社) において BigDye Terminator Ready Reaction kit 装置 (米国、PE Applied Biosystems 社) により両方のストランド (鎖) に対応してヌクレオチド・シーケンスを決定した。その後、Lasergene パッケージ (米国、ウィスコンシン州、マディソンの DNASTar 社) の SeqMan 4.00 モジュールを用いてシーケンス分析を行なった。さらに、Lasergene パッケージ (米国、ウィスコンシン州、マディソンの DNASTar 社) の MegAlign 4.00 モジュールによりシーケンスの位置合わせおよび系統樹の構成を計算処理した。収集した多数個のシーケンス位置合わせ結果をシーケンスの重み付けにおいて用いた。遺伝子型類別処理用の 28 個の対照標準株を文献に記載されているシーケンスから誘導した。

【0010】実施例 3: S-HBs・Ag クローニングおよび過渡的蛋白発現

上記のPCR生成物をXba-I/EcoR-I制限酵素により消化した。595個の塩基対フラグメントによりアミノ酸のロイシン(32)から端部(イソロイシン(226))までS-HBsAg蛋白の86%をコード化した。その後、このフラグメントを予め構成しておいた哺乳類の発現ベクターに結合して、CMWプロモーターの下流側に配置されていた野生型ayw・S-HBs・Agフラグメントと置き換えた。次に、LIPOFECTAMINE Plus試薬(米国、メリーランド州のLife technologies社)を用いてCOS-7細胞系についてトランスフェクションを行なった。その後、COS-7細胞感染により分泌した変異体S-HBs・Agを含有している培養液の上澄み液を収集して、新鮮な培地をトランスフェクション後の72時間おきに加えた。野生型ayw(wt(ayw))・S-HBs・Ag(GeneBank受け入れ番号J02203)もまた対照として使用するために発現した。

【0011】実施例4: 組換え型HBs・Ag抗原免疫測定およびエピトープ分析

組換え型wt(ayw)およびLBN変異体S-HBs・Agの発現をサンドイッチ形式における固相EIA(酵素免疫測定)により決定した。1種類のポリクローナル抗体および6種類のモノクローナル抗体(mAb(s))のパネルを用いてこの調査を行なった。これらはヤギの抗HBs・Ag(ay/ad)(米国、マサチューセッツ州、フィッツジェラルド社)、HB-1、HB-8、HB-9、HB-13、HB-14およびHB-16である。6種類全てのモノクローナル抗体mAb(s)を血清誘導した野生型のHBs・Agに対応して培養し、これらはadおよびayの両方の亜類型に対して反応性を有していた。EIA(酵素免疫測定)により血清および組換え型HBs・Agの反応性を測定した。基本的に、精製したモノクローナル抗体mAb(s)またはポリクローナル抗HBs・Agをマイクロタイター・プレート上に塗布して使用時まで4℃に維持した。酵素免疫測定(EIA)を行なう前に、各プレートをBSAを含有するPBSにより25℃で2時間遮断した。さらに、50μLのHRP接合体の各モノクローナル抗体と混合した150μLのサンプル(血清または希釈した組換え型HBs・Ag培養液)により抗体酵素免疫測定(EIA)を1工程のサンドイッチ形式で行なった。各プレートを37℃で90分インキュベートした後に、0.005%のTween 20を含有するPBSにより6回洗浄した。次に、200μLのOPD溶液(米国、シグマ社)を伴う30分間の最終的なインキュベーションにより各プレートを現像した。その後、50μLの4規定(4N)硫酸により着色現像を停止した。この吸光度を自動マイクロタイター・プレート読取装置(米国、Molecular Devices社)上で読み取り、これらの結果を490nm(ナノメートル)における光学密度(OD)として表現した。未変性または原生のHBs・Agおよび合成ペプチドに対する各モノクローナル抗体(mAb)の反応性を評価するために、直接酵素免疫測定(direct EIA)法を行なった。すなわち、精製して量的に調節した各モノクローナル抗体(mAb)の一連の希釈物をプレート上でインキュベートし、これらの各プレートは精製した未変性のHBs・Agまたは酸化処理したペプチドにより予め塗布していた。ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ接合したラビット抗マウスIgGを伴う次のインキュベーションにより結合したマウスIgGを検出した。この反応性を酵素触媒化OPD着色現像処理により確認した。組換え型変異体および野生型S-HBs・Agもウエスタン免疫ブロット法により分析した。HBs・Agの培養液の上澄み液を遠心フィルター(米国、Millipore社、Biomax-100)により15倍に濃縮した。この濃縮物をNuPAGE 10%ビスートリスSDSゲル(米国、サンディエゴ、Novex社)上で展開した後に、ニトロセルロース膜に移した。移した蛋白をHBs・Agモノクローナル抗体(mAb)により免疫ブロット処理した。この結合は免疫ブロット・システム(米国、BioRad, GAM-AP社)を用いて検出した。

【0012】実施例5: HBs変異体DNAシーケンスおよびアミノ酸シーケンスの分析

新規なLebanese(LBN)変異体のHBs・DNAシーケンスを遺伝子型について分析した。変異体のHBs・DNAシーケンスとその他の28種類の特定のHBs遺伝子型株との間のシーケンス比較によりこの変異体HBsを遺伝子型D群に分類した(図1)。この患者の血清についての血清学的な型の類別は行なわなかったが、このHBs変異体のアミノ酸シーケンスはayw2・HBs亜類型に対して最も高い相同性を示した。5種類の全てのクローン体において上記LBN変異体の位置32乃至位置226内における5種類のアミノ酸変異が見られた。これらは位置103のM(メチオニン)(ATG)→I(イソロイシン)(ATT)、位置118のT(トレオニン)(ACG)→K(リジン)(AAG)、位置120のP(プロリン)(CCA)→Q(グルタミン)(CAA)、位置170のL(ロイシン)(TTA)→S(セリン)(TCA)および位置213L(ロイシン)(TTA)→S(セリン)(TCA)である。アミノ酸位置122においては、3種類のクローン体がArg(アルギニン)(AGA)のシーケンスを有していたが、2種類のクローン体はLys(リジン)(AAA)のシーケンスを有していた。組換え型LBNのHBs・Ag発現においては、Arg(アルギニン)(位置122)を有するシーケンスを用いた。

LBN -I-----K-Q-----

【0013】野生型HBs・Agのコンセンサス・シーケンス（共通配列）を遺伝子型D群の別の3種類の株（X02496、M32138およびS7）から誘導した。太字は「a」決定因子領域を示している（Stirk HJ, Thornton JM, Howard CRの「B型肝炎の表面抗原に対応するトポロジカル・モデル（A topological model for hepatitis B surface antigen）」（Intervirology、1992年、33（3）、第148頁乃至第158頁））。

【0014】実施例6：COS-7細胞における組換え型HBs・Agの過渡的発現

分泌した組換え型HBs・Ag発現は精製した野生型の組換え型HBs・Agで換算して0.1mg/リットル乃至0.2mg/リットルの範囲内であった。培養液の上澄み液内の分泌したHBs・Agのみの発現について調べた。この結果、72時間および144時間の各時点における発現量において有意差はなかった。72時間および144時間において収集した上澄み液に比較して216時間において収集した培養液の上澄み液は1/5のみの発現したHBs・Agを示した。

【0015】実施例7：免疫反応性の分析

組換え型HBs・Ag（ayw）および新規な変異体HBs・Ag（LBN）の各培養液の上澄み液を6種類のモノクローナル抗体（mAb（s））から成るパネルによりそれぞれの反応性について調べた。各培養液の上澄み液を1:40または40倍に希釈して同量の抗原濃度

を確保した。この結果、各アミノ酸変異体は野生型（wt）HBs・Agに対する4種類のモノクローナル抗体（mAb（s））の結合親和性に明らかに影響を及ぼした。HB-16が最も影響を受けて、約90%の結合強度が失われた。一方、予想外に、2種類のモノクローナル抗体（mAb（s））、すなわち、HB-13およびHB-14のLBN変異体に対する結合強度は5倍乃至6倍に有意差をもって増加した。ペプチド・マッピングにより、上記の2種類の抗体が最初のループ領域内の線形シーケンスに対して特異的であり、モノクローナル抗体（mAb）のHB-9は第2のループ領域に配置されている位置137乃至位置147のシーケンスに対して特異的であることが分かった。さらにHB-1、HB-8およびHB-16の3種類のモノクローナル抗体（mAb（s））は全て一致した特異性を示した。これらは免疫ブロット処理においてSDS変性したHBs・Agに対して反応しないが、直接酵素免疫測定（EIA）において比較的高い希釈タイター（滴定量または力価）を示した。一方、モノクローナル抗体（mAb（s））のHB-13およびHB-14は野生型およびLBN型の両方のHBs・Agに対して良好にブロットされ、これら2種類のモノクローナル抗体（mAb（s））が変異部位に関係なく変性した各エピトープを認識していることを示した。

【表1】

		野生型 HBs・Agに対応して培養したモノクローナル抗体											
		HB-1		HB-8		HB-9		HB-13		HB-14		HB-16	
LBN変異体*に対するmAbの相対的反応性（%）		55.5		55.7		35.3		530.1		665.2		10.3	
未変性 HBs・Ag**に対するmAbのタイター		1:8×10 ⁵		1:2×10 ⁵		1:2×10 ⁴		1:4×10 ⁴		1:4×10 ⁴		1:4×10 ⁵	
ペプチド (位置122乃至位置137) #		0.161	1:50	0.154	1:50	0.125	1:50	>2.00	1:2K	>2.00	1:500	0.121	1:50
ペプチド (位置139乃至位置147) #		0.183	1:50	0.223	1:50	>2.00	1:500	0.250	1:50	0.331	1:50	0.119	1:50
ペプチド (位置122乃至位置147) #		0.201	1:50	0.261	1:50	>2.00	1:2K	0.292	1:50	0.340	1:50	0.143	1:50
ウエスタン免疫 ブロット法	野生型 (ayw)	-		-		n.p.		++		+++		-	
	LBN	-		-		n.p.		++		+++		-	

【表2】

【表1について】：酵素免疫測定（EIA）およびウエスタン免疫プロット法における種々の抗原に対するモノクローナル抗体のパネルにおける免疫反応性

*：相対的反応性を100%に設定した野生型（ayw）に対する各モノクローナル抗体（mAb）の反応性から誘導した光学密度（OD）に比較した場合のLBN変異体に対する各モノクローナル抗体（mAb）の反応性から誘導した光学密度（OD）として示した。

**：モノクローナル抗体（mAb）タイターを未変性HBs・Agによる直接酵素免疫測定（EIA）において光学密度=1.00乃至1.25の間の所定信号を得るために各モノクローナル抗体（mAb）に対して必要とされる希釈率として表現した。

#：反応性を指定された希釈率における各モノクローナル抗体（mAb）から得た光学密度（OD）として表現した。全てのモノクローナル抗体（mAb(s)）の濃度を同一濃度の開始点となるように調節した。全てのペプチド・シーケンスを野生型（ayw）に基づいて決めた。

n.p.：実行せず。ウエスタン免疫プロットの結果を視覚的に決定した。

【0016】本発明の実施態様は以下の通りである。

（1）組換え型宿主内において変異体B型肝炎表面抗原を発現するための発現ベクターであって、請求項1に記載の変異体B型肝炎表面抗原をコード化する組換え型遺伝子を含むベクター。

（2）請求項1に記載の変異体B型肝炎表面抗原に対応して培養したモノクローナル抗体。

（3）実施態様（2）のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系。

（4）B型肝炎表面抗原に対して特異的に結合する少なくとも1種類のモノクローナル抗体を含むコンテナを備えている検査サンプル中のB型肝炎の存在を決定するための検定装置であって、前記モノクローナル抗体が実施態様（3）に記載のハイブリドーマ細胞系により分泌されたモノクローナル抗体である装置。

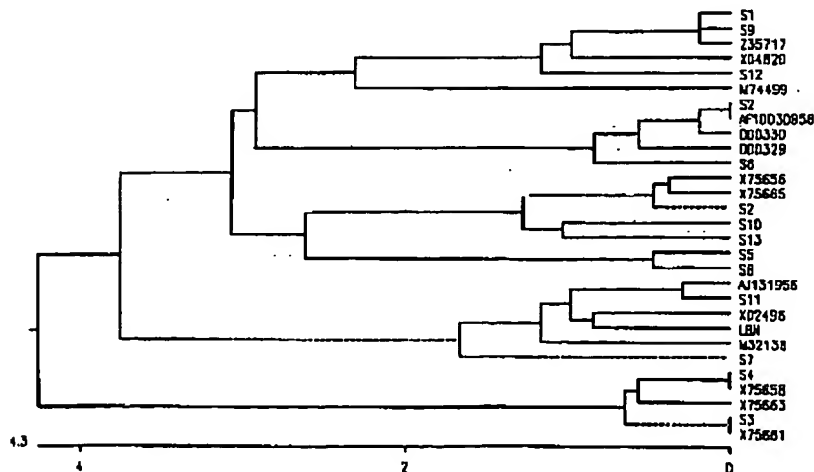
【0017】

【発明の効果】従って、本発明によれば、B型肝炎ウイルス表面抗原（HBs・Ag）の新規な表面変異体が提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】HBs・Ag（B型肝炎表面抗原）ゲノムの系統樹および受け入れ番号（accession numbers）を示す図である。一連のS1株乃至S13株を文献（Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, およびMagnius L0の「B型肝炎の9種類の異なる血清型のアミノ酸シーケンスの比較および対応するB型肝炎ウイルス株のゲノム分類」（J Gen Virol. 1992年5月、73（第5部）、第1201頁乃至第1208頁）に基づいて入手した。GenBank受け入れ番号を残りの各株に対して記載した。

【図1】



フロントページの続き

(71)出願人 501131014

100 Indigo Creek Drive,
Rochester, NY
14626-5101, U. S. A.

(72)発明者 ジアン・ゼン

アメリカ合衆国、08869 ニュージャージー
州、ラリタン、レンジ・ロード 7

Fターム(参考) 4C085 AA05 BA89 EE01 GG01

4H045 AA11 AA30 BA10 CA02 DA86
EA53 FA73

【外国語明細書】

1. Title of Invention

A NOVEL HEPATITIS B VIRUS

2. Claims

1. An isolated variant hepatitis B surface antigen comprising an amino acid sequence wherein mutations from hepatitis B wild type ayw2 strain appear as follows: at position 103 isoleucine is present instead of methionine, at position 118 lysine is present instead of threonine, at position 120 glutamine is present instead of proline, at position 170 serine is present instead of leucine, and at position 213 serine is present instead of leucine.
2. A method for determining the presence of hepatitis B in a test sample, comprising:
 - a. contacting a test sample with at least one monoclonal antibody claimed in claim 3 attached to a solid phase, to form a mixture,
 - b. incubating the mixture for a time and under conditions sufficient to form antigen-antibody complexes,
 - c. contacting the complexes with an antibody conjugated to a signal generating reagent that is specific for the complexes, and
 - d. determining the presence of hepatitis B present in the test sample by detecting the signal generated.

3. Detailed Description of Invention

BACKGROUND OF THE INVENTION

Hepatitis B virus (HBV), a small double stranded DNA virus, can cause a wide spectrum of clinical presentations: asymptomatic carrier state, acute self-limited hepatitis, fulminant hepatitis, and chronic liver diseases including chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. It has a circular genome of 3182 to 3221 base pairs (bp). Four major subtypes have been identified and can be differentiated by antibodies that recognize the different epitopes on the HBV surface. The HBsAg particles carry the common determinant, "a", as well as d or y and w or r subtype determinants, and are classified into the four major subtypes, i.e., adw, adr, ayw and ayr. Rare sera contain HBsAg particles with all four-subtype determinants (adywr). The antigenic determinants for the main HBV subtypes: adw, adr, ayw and ayr lie in the surface or "S" polypeptide. Two amino acid residues in particular, encoded by the S gene at codon positions 122 and 160, have been postulated to determine the different antigenic subtypes. While, the preC regions have frequently been reported to have mutations rendering HBe Ag negative. The virus has a high rate of mutation relative to other DNA viruses due to its mode of replication by reverse transcriptase of its pregenomic RNA. The importance of a novel mutant

can be reflected in vaccine escape and HBsAg detection failure, implicating a public health problem.

Summary of the Invention

We have identified and characterized a new surface mutant of HBV. The mutant was isolated from a symptomatic patient with Down's syndrome who was found to be persistently positive for both for HBsAg and anti-HBs Antibody (Ab) with an equally long-lasting anti-HB core (c) IgM Ab. With a panel of six monoclonal antibodies (mAb(s)) to HBsAg, we evaluated the mutation influence on the major epitope of the "a" determinant antigenicity.

Detailed Description

A sample was taken from a 43-year-old white male patient with Down's syndrome who presented with jaundice to the

American University of Beirut Medical Center in March 1999. The patient had no history of immunization to HBV, no transmissible risk factor including blood transfusion, IV drugs, homosexuality, family HBV infection or hemodialysis. During investigation, he was found to have elevated liver function tests (LFT): ALT 450 IU/L (range 10-35 IU/L), AST 250 IU/L (range 10-40 IU/L), gamma-GT 383 IU/L (range 10-50 IU/L), Bilirubin was 3.8/2.6 mg/dL (total/direct) (range, total: 0.1-1.2 IU/L and direct: 0.0-0.2 IU/L). More significantly, we noted incongruity in the HBV blood tests. The HBV markers test results using enzyme immunoassay (EIA) methodology were as follows: HBs Ag positive ($>2/0.051$), anti-HBs Ab positive (0.417/0.206), anti-HBc IgM Ab low positive (0.371/0.208), anti-HBc IgG Ab strong positive ($>2/0.412$), HBe Ag negative and anti-HBe Ab positive (0.197/0.830, a competitive assay). Both the anti-hepatitis A Ab and the anti-hepatitis C Ab were negative. Due to the discrepancy in the HBV markers, molecular methods were used to confirm the HBV antigen.

The patient was continuously followed up for LFT that decreased consistently over the following ten months including AST 80 IU/L. However, the HBV markers that were repeated ten months after initial presentation revealed both HBsAg positive ($>2/0.056$) (DiaSorin, Italy) and anti HBs Ab positive (56/5) (BioMerieux, Mini-Vidas, France), and the persistence of a low

positive anti-HBc IgM Ab (0.303/0.221) (DiaSorin, Italy).

Example 1: Extraction and Amplification of HBs DNA

DNA was isolated and purified from 10 uL samples based on a guanidinium-thiocyanate (GuSCN) lysis method. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction was used with some modifications. Five volumes of lysis solution [5.75 M GuSCN, 50 mM Tris-Cl pH7.5, 100 mM 2-mercaptoethanol and 15 ug/mL poly (A)] were added to 1 volume of serum.

After a brief vortex, the mixture was heated at 60°C for 10 minutes. The DNA pellet was obtained with isopropanol precipitation, and was washed with 75% ethanol. Dried DNA pellet was then resuspended in 50 uL of PCR reaction solution, with 40 uM (each) of the first-round primers (F1-6 and R1-6). The mixture was heated to 95°C for 3 min, followed by 30 PCR cycles consisting of 94°C/45 sec, 55°C/45 sec and 72°C/45 sec in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, USA). 0.5 uL of the first-round PCR product was then served as template for a second-round PCR amplification using F1-7 and R13-2d primers pair consisting same cycles except annealing temperature was raised to 60°C. Positive PCR products, a DNA band of 604bp as expected, were detected in agarose gel electrophoresis.

The PCR Primer sequences [nucleotide sequences were derived from HBV DNA (accession number J02203) were as follows:

First-round Primer Set:

F1-6 (231-252): CCTCACAATACCGCAGAGTCTA
 R1-6 (816-842): AGGGTTTAAATGTATACCCAAAGACAA

Second-round Primer Set:

F1-7 (246-268): GAGTCTAGACTCGTGGTGGACTT
 R13-2d (822-843): ccgaattcTAGGGTTTAAATGTATACCCA

An EcoR I site was added at the 5'-end of R13-2d for cloning purpose.

Example 2: Sequence Alignment and Phylogenetic Analysis

Amplified PCR product was cleaned with a QIAquick spin column (Qiagen) and subsequently cloned for DNA sequencing and protein expression. Five clones were sent for DNA sequencing in order to obtain reliable DNA sequence determination. Nucleotide sequences were determined for both strands with the BigDye Terminator Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, USA) on an ABI 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, USA). Sequence analysis was performed using SeqMan 4.00 module of the Lasergene package (DNASTar Inc., Madison, WI, USA). Sequence alignment and the construction of phylogenetic trees were computed by MegAlign 4.00 module of the Lasergene package (DNASTar Inc., Madison, WI, USA). Clustal multiple sequence alignment was used through sequence weighting. The 28 reference strains for genotype grouping were derived from published sequences.

Example 3: S-HBsAg Cloning and Transient Protein Expression

The PCR product was digested by Xba I /EcoR I restriction enzymes. The 595 bp fragment encoded 86% of the S-HBsAg protein from amino acids Leu 32 to the end (Ileu 226). The fragment was then ligated into a previously constructed mammalian expression vector, to replace the wild-type ayw S-HBsAg fragment, which was placed downstream of a CMV promoter. The transfection was then performed on a COS-7 cell line using LIPOFECTAMINE Plus reagent (Life technologies, MD, USA). Culture supernatant containing secreted variant S-HBsAg from the COS-7 cell infections was then harvested and fresh medium was added every 72 hours after transfection. Wild-type ayw [wt(ayw)] S-HBsAg, (GeneBank accession number J02203), was also expressed for control use.

Example 4: Recombinant HBsAg Antigen Immunoassay and Epitope Analysis

Recombinant wt(ayw) and LBN variant S-HBsAg expression was determined by solid-phase EIA in a sandwich format. One polyclonal and a panel of six monoclonal antibodies [mAb(s)] were used in this study. They were goat anti-HBsAg (ay/ad) (Fitzgerald, MA, USA), HB-1, HB-8, HB-9, HB-13, HB-14 and HB-16. All six mAb(s) were raised against serum derived wild-type HBsAg and were reactive to both ad and ay subtypes. EIA were used to measure serum and recombinant HBsAg reactivity. Basically, purified mAb(s) or polyclonal anti-HBsAg were coated on

a microtiter plate and kept at 4°C until use. Prior to performing EIA, the plates were blocked with PBS containing BSA for 2 hours at 25°C. EIA was performed in a one-step sandwich format with 150 uL of sample (serum or diluted recombinant HBsAg culture) mixed with 50 uL HRP conjugated monoclonal antibodies. The plates were incubated at 37°C for 90 minutes, then washed 6 times with PBS containing 0.005% Tween 20. The plates were developed by a final incubation for 30 minutes with 200 ul of OPD solution (Sigma, USA). Adding 50 uL of 4N Sulfuric acid then stopped the color development. The absorbance was read on an automatic microtiter plate reader (Molecular Devices, USA) and the results were expressed as optical density (OD) units at 490 nm. To evaluate the mAb reactivity to the native HBsAg and to the synthetic peptides, direct EIA procedure was performed. A serial dilution of each purified and quantity adjusted mAb was incubated on plates, which were previously coated with purified native HBsAg or oxidized peptides. Bound murine IgG were detected by a second incubation with horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG. The reactivity was ascertained by enzyme catalyzed OPD color development. Recombinant variant and wild-type S-HBsAg were also analyzed by western immunoblot. HBsAg culture supernatant was concentrated 15 fold by a centrifugal filter (Biomax-100, Millipore, USA). The concentrate was run on a NuPAGE 10% Bis-Tris SDS Gel (Novex, San Diego, USA) and

then transferred to nitrocellulose membrane.
 Transferred protein was immunoblotted with HBsAg mAb.
 The binding was detected using an immunoblot system
 (BioRad, GAM-AP, USA).

Example 5: HBs Variant DNA Sequence and Amino Acid Sequence Analysis

The HBs DNA sequence of this novel Lebanese (LBN) variant was analyzed for genotypes. Sequence comparison between variant HBs DNA sequence and other 28 defined HBs genotype strain put this variant HBs into genotype D group (Fig. 1). Although serological typing on this patient's serum was not performed, the amino acid sequence of this HBs variant showed highest homology with ayw2 HBs subtype. Five amino acid mutations within position 32-226 of LBN variant were observed in all five clones. They are 103 M (ATG) → I (ATT), 118 T (ACG) → K (AAG), 120 P (CCA) → Q (CAA), 170 L (TTA) → S (TCA) and 213 L (TTA) → S (TCA). At amino acid position 122, three clones revealed sequence Arg (AGA) while 2 clones revealed sequence as Lys (AAA). For recombinant LBN HBsAg expression, sequence with Arg (122) was used.

	102	-	110	-	120	-	130	-	140	-	150
wt(ayw2)	GMLEVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGMCTCI										
LBN	-I-----K-Q-----										

Wild-type HBsAg consensus sequence was derived from other three strains (X02495, M32138 and S7) of the genotype D group. Bold indicates the "a" determinant

region (Stirk HJ, Thornton JM, Howard CR. A topological model for hepatitis B surface antigen. Intervirology. 1992;33(3):148-58)

Example 6: Recombinant HBsAg Transient Expression in COS-7 Cell

The secreted recombinant HBsAg expression was in a range of 0.1-0.2 mg/liter, calibrated by a purified wild-type recombinant HBsAg. Only secreted HBsAg in culture supernatant was examined for expression. There was no significant expression yield difference at 72 hours and 144 hours time point. The culture supernatant harvested at 216 hours gave only 1/5 expressed HBsAg compared to the supernatants collected at 72 and 144 hours.

Example 7: Immunoreactivity Analysis:

Both the recombinant HBsAg (ayw) and the novel variant HBsAg (LBN) culture supernatants were tested for their reactivity by a panel consisting of six mAb(s). Culture supernatants were diluted 1:40 to insure the same quantity of antigen concentration. Amino acid mutations apparently affected four mAb(s) binding affinity to wt HBsAg. HB-16 was affected most, losing almost 90% strength. Strikingly, the binding strength of two mAb(s), HB-13 and HB-14, to the LBN variant was significantly increased to 5-6 fold. Peptide mapping revealed that these two antibodies were specific to the first loop linear sequence while mAb HB-9 was specific to the sequence from 137 to 147, located in the second

loop region. All the three mAb(s), HB-1, HB-8 and HB-16, are conformation specific. They did not react with SDS denatured HBsAg in immunoblot but had higher dilution titer in direct EIA assay. On the other hand, the mAb(s) HB-13 and HB-14 blotted to both wild type and LEN HBsAg very well, indicating that these two mAb(s) recognize denatured epitopes, independent of the mutation sites.

Monoclonal antibodies raised against wild type HBsAg													
		HB-1		HB-8		HB-9		HB-13		HB-14		HB-15	
mAb relative reactivity (%) to LBN variant *		55.5		55.7		35.3		530.1		385.2		10.3	
mAb titer against native HBsAg **		1: 8 X10 ³		1: 2 X10 ³		1: 2 X10 ³		1: 4 X10 ³		1: 4 X10 ³		1: 4 X10 ³	
peptide (122-137) #		0.161	1:50	0.154	1:50	0.125	1:50	>2.00	1:2K	>2.00	1:500	0.121	1:50
peptide (139-147) #		0.183	1:50	0.223	1:50	>2.00	1:500	0.250	1:50	0.331	1:50	0.119	1:50
peptide (122-147) #		0.201	1:50	0.281	1:50	>2.00	1:2K	0.282	1:50	0.340	1:20	0.143	1:50
Western Immunoblot		wt (ayw)		LBN		n.p.		n.p.		+++		+++	
		-		-		n.p.		++		+++		-	

Table 1. Immunal reactivity of a panel of monoclonal antibodies to various antigens in EIA assay and in western immunoblot

* Relative reactivity was presented as OD derived from each mAb reactivity to LBN variant compared with OD derived from its reactivity to wt (ayw) which was set at 100%.

** mAb titer was expressed as dilution needed for each mAb to obtain a preset signal between OD=1.00 to 1.25 in a direct EIA with native HBsAg.

Reactivity was expressed as OD obtained from each mAb at indicated dilution. All mAb(s) concentration was adjusted at a same concentration start point. All peptide sequence was based on wt (ayw).

n.p. : not performed. Western immunoblot results were visually determined.

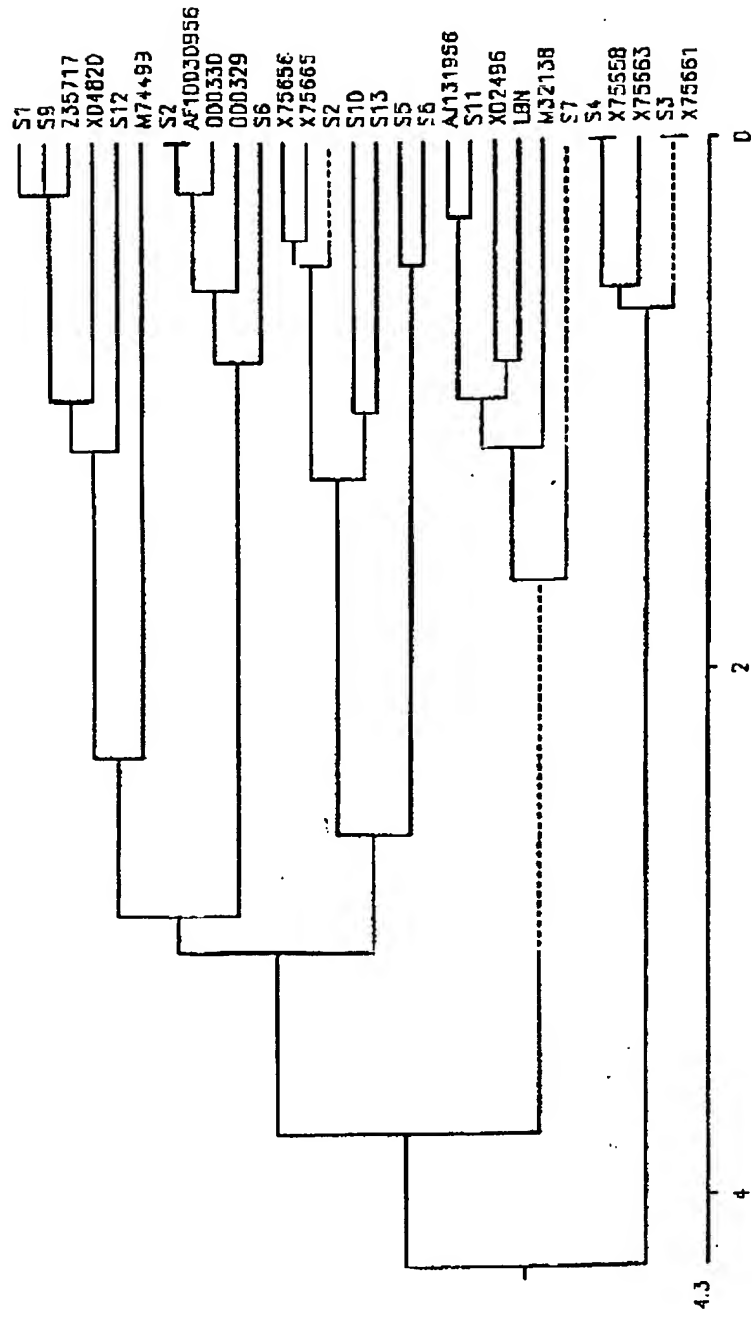
4. Preferred aspects are provided as stated in the followings

- (1) An expression vector for expression of a variant hepatitis B surface antigen in a recombinant host, wherein said vector contains a recombinant gene encoding the variant hepatitis B surface antigen of claim 1.
- (2) A monoclonal antibody raised against the variant hepatitis B surface antigen of claim 1.
- (3) A hybridoma cell line which secretes the monoclonal antibody of aspect(2).
- (4) An assay kit for determining the presence of hepatitis B in a test sample, comprising: a container containing at least one monoclonal antibody which specifically binds to hepatitis B surface antigen wherein the monoclonal antibody is a monoclonal antibody secreted by the hybridoma cell line claimed in aspect(3).

5. Brief Description of the Drawings

Figure 1 illustrates the phylogeny tree of the HBsAg genomes and the accession numbers. Sequence of S1 - S13 strains are obtained from reference (Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. J Gen Virol. 1992 May;73 (Pt 5):1201-8); GenBank accession numbers are given for the rest of strains.

【図1】



1. Abstract

We isolated and characterized a new surface mutant of the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). The mutant was isolated from a symptomatic patient with Down's syndrome who was found to be persistently positive for both for HBsAg and anti-HBs Antibody (Ab) with an equally long-lasting anti-HB core (c) IgM Ab

2. Selected Drawings

Fig.1